

СЕКЦИЯ VI

НОВЫЕ ПОДХОДЫ К СОЗДАНИЮ
ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ

Доклады

**Исследование противоопухолевого
воздействия дизинтегрин
обтустатина из яда закавказской
гюрзы (*Macrovipera lebetina obtusa*)
на мышях с саркомой Крокера (S-180)**

Н.М. Айвазян, Н.А. Казарян, Л.А. Гуликян,
А.В. Кишмирян, Г.В. Гукасян

Институт физиологии им. акад. Л.А. Орбели
НАН РА, Ереван

Введение. Исследования последних лет доказали, что токсины змеиных ядов проявили себя не только в качестве важных инструментов для изучения молекулярных основ различных физиологических процессов, но также как уникальная природная кладовая прототипов терапевтических агентов для лечения самого широкого спектра патологий. Выделенный недавно из яда закавказской гюрзы дизинтегрин обтустатин является наиболее коротким из ранее описанных мономерных дизинтегринов, специфически ингибирующий интегрин $\alpha\beta 1$. Ранние опыты показали влияние данного низкомолекулярного пептида на рост и распространение меланомы, онкостатический эффект которого объясняют способностью ингибировать ангиогенез.

Задачи исследования. Выявление ингибирующего влияния обтустатина, а также низких доз самого яда на рост саркомы S-180 у мышей *in vitro* и *in vivo*.

Материалы и методы. Применяли как классические методы определения интенсивности роста опухоли и гистологические исследования, так и методы молекулярно-биологических и биофизических подходов (хемилюминесцентный анализ, сравнительное исследование перекисного окисления липидов тканей и ак-

тивности ферментов системы антирадикальной защиты, анализ на замедление подвижности ДНК в геле, EMSA).

Результаты. Результаты исследования позволяют говорить о стойком подавлении роста опухоли на 33–50 % дизинтегрином и цельным ядом при ежедневных инъекциях в дозах 10 мкг/мышь или 1 мг/кг. Наблюдали также достоверное уменьшение фона окислительных процессов в обеих экспериментальных группах, а также интенсификация активности супероксиддисмутазы в организме.

Выводы. Таким образом, дизинтегрины зоотоксинов могут стать основой синтеза новых противоопухолевых препаратов, направленных, в первую очередь, на замедление и остановку роста злокачественных новообразований, блокируя рецепторы адгезии клеток опухоли и сосудов.

**Разработка мономолекулярного
химерного рецептора Т-лимфоцитов
человека для использования
в лечении опухолей, положительных
к раково-эмбриональному антигену**

В.К. Боженко, А.Н. Шкопоров, А.М. Шишкин, В.А. Солодкий
ФГБУ «Российский научный центр рентгенодиагностики»
Минздрава России, Москва

Введение. Адаптивная терапия злокачественных опухолей с помощью Т-лимфоцитов, несущих искусственные мономолекулярные химерные рецепторы (chimeric antigen receptor, CAR), является одним из актуальных направлений современной иммунотерапии в онкологии.

Задачи исследования. Создание CAR, специфичного к раково-эмбриональному антигену (РЭА) — одному из наиболее распространенных канцер-антигенов.

Материалы и методы. Рецептор создавали методами генной инженерии на основе сиквенса моноклонального антитела к РЭА и известных нуклеотидных последовательностей различных доменов рецептора. Полученный ген рецептора был клонирован в вектор pCI, содержащий промоторный участок цитомегаловируса. Плазмиду, содержащую ген рецептора, доставляли в Т-лимфоциты методом электропорации. Цитотоксические свойства Т-лимфоцитов, несущих предложенный рецептор, исследовали на культурах РЭА-положительных опухолевых клеток и на модели бестимусных мышей с перевитой злокачественной опухолью человека, полученной из РЭА-положительной культуры НСТ-116.

Результаты. Получен мономолекулярный рецептор, состоящий из распознающей части на основе scFv-фрагментов моноклонального антитела к РЭА, участков CD28 как трансмембранного и активационного домена, CD137 (4-1BB) как активационного домена и ζ -цепи (CD247) в качестве эффекторного домена. В исследованиях *in vitro* мы показали структурную и функциональную состоятельность синтезируемых трансфицированными Т-лимфоцитами химерных мономолекулярных рецепторов. Выявлено цитотоксическое влияние на культуры опухолевых клеток. В экспериментах *in vivo* на бестимусных мышах отмечено статистически достоверное увеличение выживаемости в группе, получавшей терапию трансфицированными лимфоцитами по сравнению с контрольными группами.

Исследования фармакокинетики Т-лимфоцитов с химерными мономолекулярными рецепторами к РЭА показали длительное персистирование их в кровотоке. Достаточный для оказания противоопухолевого эффекта уровень трансфицированных Т-лимфоцитов наблюдался в течение недели. Это означает, что для эффективного применения предлагаемой методики необходимы повторные инъекции Т-лимфоцитов, но, в то же время, этот уровень снижает вероятность бесконтрольной пролиферации введенных лимфоцитов, ведущих к таким осложнениям как «цитокиновый шторм».

Выводы. Доклинические исследования предложенного искусственного химерного рецептора Т-лимфоцитов к РЭА показали его эффективность и возможность использования для проведения клинических испытаний.

Ингибиторы тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы 1 – потенциальные антираковые препараты

А.Л. Захаренко¹, К.П. Волчо², Т.М. Хоменко²,
О.А. Лузина², Е.В. Суслов², J. Reynisson³, Н.А. Попова⁴,
О.Д. Захарова¹, В.И. Каледин⁴, В.П. Николин⁴,
Н.Ф. Салахутдинов², О.И. Лаврик¹

¹ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН», Новосибирск;

²ФГБУН «Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН», Новосибирск;

³School of Chemical Sciences, University of Auckland, New Zealand;

⁴ФГБУН «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», Новосибирск

Введение. Тирозил-ДНК-фосфодиэстераза 1 (TDP1) — перспективная мишень для противоопухолевой терапии, основанной на повреждении опухолевой ДНК, вызванной ингибиторами топоизомеразы 1 (Top1). TDP1 играет ведущую роль в репарации ковалентных комплексов Top1-DNA, образовавшихся под воздействием ингибиторов Top1, таких как камптотecin и его клинические производные. Предположительно, что ингибирование TDP1 может усилить терапевтический эффект ингибиторов Top1, сенсibiliзируя опухолевые клетки к их действию.

Задачи исследования. Поиск эффективных ингибиторов TDP1 среди природных биологических активных соединений. Определение среди наиболее эффективных ингибиторов их собственной цитотоксичности по отношению к культурам опухолевых клеток и их влияния на цитотоксический эффект камптотецина. Изучение влияния наиболее перспективных соединений на рост и метастазирование карциномы Льюиса *in vivo*.

Материалы и методы. Влияние соединений на активность очищенного фермента определялось с использованием флуоресцентного биосенсора, позволяющего следить за накоплением продуктов реакции в режиме реального времени. Цитотоксичность соединений как монопрепаратов и в сочетании с камптотечином определяли с помощью стандартного МТТ-теста в отношении клеток линий MCF-7, RPMI 8226 и HepG2. Для экспериментов *in vivo* использовали мышей линии C57BL/6 с привитой подкожно метастазирующей в легкие карциномой Льюиса.

Результаты. В исследованиях *in vitro* установлена высокая ингибирующая активность соединений в отношении очищенной рекомбинантной человеческой TDP1 (величины IC₅₀ — концентрации, при которых активность TDP1 снижена наполовину — находились в диапазоне от 0,1 до 15 мкМ). Среди них отобраны соединения, малотоксичные в отношении перевиваемых опухолевых клеточных линий в концентрации 50 мкМ. В комбинации с камптотечином некоторые

из этих соединений повышают цитотоксический эффект камптотецина в 2–12 раз, будучи использованы в заведомо нетоксичных концентрациях. В исследованиях *in vivo* установлено, что под действием ингибитора TDP1 имеет место 30 % снижение объема первичной опухоли и, по меньшей мере, двукратное усиление противометастатического эффекта топотекана при карциноме Льюиса.

Выводы. Обнаружен ряд эффективных ингибиторов фермента репарации ДНК TDP1. Показана способность ингибиторов TDP1 усиливать цитотоксический эффект камптотецина *in vitro* и противометастатический эффект его производного топотекана *in vivo*.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 16-13-10074).

PF-114, новый ингибитор тирозинкиназы Bcr-Abl, снижает фосфорилирование CrkL и вызывает гибель клеток хронического миелоидного лейкоза

Е.С. Колотова¹, В.В. Татарский¹, А.А. Зейфман²,
О.В. Строганов², В.С. Стройлов², И.Ю. Титов²,
Ф.Н. Новиков², А.А. Калинина¹, А.Г. Туркина³, Г.Г. Чилов⁴,
А.А. Штиль¹, В.Ю. Шульгина⁴

¹ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва;

²ФГБУН «Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН», Москва;

³ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России, Москва;

⁴ООО «Фьюжен Фарма», Москва

Введение. Преодоление резистентности к ингибиторам 1–2-го поколений, вызванной мутациями в химерной тирозинкиназе Bcr-Abl — одна из важных задач при лечении больных хроническим миелоидным лейкозом (ХМЛ). С использованием метода молекулярного моделирования нами разработан ингибитор Bcr-Abl 3-го поколения PF-114, показавший эффективность в доклинических исследованиях при ХМЛ с наиболее частой мутацией T315I. В настоящее время проводится клиническое исследование PF-114 на базе Гематологического научного центра. В рамках планируемого исследования 1-й фазы предполагаются изучение безопасности и эффективности препарата у резистентных пациентов, поиск оптимальной дозы препарата для дальнейших исследований.

Задачи исследования. Изучение механизмов гибели клеток ХМЛ при действии нового ингибитора тирозинкиназы Bcr-Abl.

Материалы и методы. Исследовали клетки линии K562 (ХМЛ). Определяли цитотоксичность, выполняли иммуноблоттинг, проточную цитофлуориметрию. Определяли внутриклеточный пул CrkL (фосфорилированная и нефосфорилированная формы).

Результаты. Гибель клеток K562 (Bcr-Abl⁺) происходит при действии наномолярных или субнаномолярных концентраций PF-114. Для Bcr-Abl-негативных лейкозов PF-114 значительно менее активен. Гибели клеток K562 предшествует задержка клеточного цикла в фазе G1. Инкубация клеток K562 с PF-114 приводила к снижению содержания клеток с фосфорилированным CrkL — важнейшим субстратом Bcr-Abl. Апоптоз, вызываемый PF-114, сопровождается активацией каспаз 3 и 9, расщеплением поли (АДФрибозо) полимеразы, нарушением фосфорилирования белков семейства STAT и изменением активности митогенактивируемых протеинкиназ.

Выводы. Новый ингибитор Bcr-Abl преимущественно токсичен для клеток ХМЛ, проявляет высокую специфичность к патогенетически важной внутриклеточной мишени, оказывает влияние на белки, участвующие в реализации гибели клеток. Эти результаты, наряду с подавлением мутантных форм Bcr-Abl и благоприятными фармакологическими характеристиками, обуславливают перспективность создания нового препарата для лечения ХМЛ на основе соединения PF-114.

Молекулярные основы для создания нового противоопухолевого средства на основе рибонуклеазы биназы

В.А. Митькевич, И.Ю. Петрушанко, А.А. Макаров

ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН», Москва

Введение. Несмотря на успехи противоопухолевой терапии проблема повышения эффективности методов воздействия на злокачественные новообразования, особенно на их высокометастатические формы, остается актуальной. Избирательным действием на клетки опухоли могут обладать фармацевтические средства, направленные на повреждение их РНК. К настоящему времени накоплены данные о перспективности использования в этих целях рибонуклеаз (РНКаз).

Результаты. Охарактеризованы свойства РНКаз, определяющие их избирательную токсичность в отношении злокачественных клеток. Биназа является катионной гуанил-специфичной РНКазой из *Bacillus pumilus*. Показано, что она проявляет токсическую активность в отношении целого ряда злокачественных клеток человека. Биназа индуцирует гибель клеток по пути апоптоза, что является одной из ключевых особенностей, необходимых для ее потенциального использования в терапии. Важно, что биназа не индуцирует некроз клеток как в культуре, так и на уровне целого организма. На мышиных моделях показано, что биназа эффективно ингибирует рост первичных опухолей и образование метастазов и запускает регенеративные процессы в печени. Потенциальные акцепторы биназы на клетках млекопитающих — это

кислые липиды и гликопротеины, гепарансульфатсодержащие протеогликаны, актин и ассоциированные с РНК белки. Клеточные мембраны нормальных и злокачественных клеток отличаются по составу этих компонентов, что во многом определяет избирательность действия биназы. В качестве внутриклеточных мишеней биназы рассматриваются РНК различного типа, предполагается ее вмешательство в процесс РНК-интерференции. Установлено, что чувствительность опухолевых клеток к действию биназы зависит от экспрессии определенных онкогенов (*KIT*, *FLT3*, *RAS*, *AML1-ETO*).

Выводы. Выявленные молекулярно-генетические особенности опухолевых клеток, определяющие их чувствительность к действию биназы, позволят прогнозировать эффективность ее применения в отношении определенных типов опухолей. Биназа является исключительно стабильным белком, не подверженным окислительным модификациям, что позволяет препаратам на ее основе сохранять свои свойства в течение долгого времени, а также быть эффективными в клетках, подверженных окислительному стрессу, характерному для клеток опухолей. Указанные свойства биназы делают ее привлекательным объектом для разработки противоопухолевых средств.

Работа поддержана программой Президиума РАН «Фундаментальные исследования для разработки биомедицинских технологий» и РФФИ (грант № 14-04-00798_a).

Влияние отечественных метаболитических препаратов на функциональную активность гликопротеина-Р

А.В. Шулькин, И.В. Черных, Е.Н. Якушева,
Н.М. Попова, Д.О. Уткин

ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова»
Минздрава России, Рязань

Введение. Гликопротеин-Р (Pgp, ABCB1-белок) — эффлюксный белок-транспортер, участвующий в выведении химиотерапевтических препаратов — его субстратов (колхицин, топотекан) из опухолевых клеток. Повышенную активность данного белка связывают с развитием множественной лекарственной устойчивости опухолей. Кроме опухолевых клеток Pgp обнаружен в гепатоцитах, энтероцитах кишечника, эпителии проксимальных почечных канальцев, эндотелии гистогематических барьеров. Поэтому считается, что он также играет важную роль в фармакокинетике лекарственных препаратов. Ряд веществ (индукторы) может повысить активность Pgp, что приводит к развитию резистентности к проводимой терапии, а ряд

препаратов (ингибиторы) способен снизить активность белка-транспортера, что может стать следствием развития побочных эффектов.

Задачи исследования. Изучение влияния мексидола, афобазола и ноопепта на функциональную активность Pgp.

Материалы и методы. Работа выполнена на половозрелых кроликах-самцах породы шиншиллы, являющихся трансляционной моделью для оценки функционирования Pgp. Функциональную активность белка-транспортера оценивали по фармакокинетике его маркерного субстрата — фексофенадина. До начала исследования, а также после курсового введения изучаемых веществ кроликам перорально вводили фексофенадин в дозе 67,5 мг/кг массы тела и оценивали его фармакокинетику. Мексидол вводили перорально в дозе 50 мг/кг массы тела 3 раза в день в течение 10 дней, ноопепт — перорально в дозе 10 мг/кг массы тела 3 раза в день в течение 14 дней, афобазол — перорально в дозе 3,8 мг/кг массы тела 3 раза в день в течение 14 дней.

Результаты. Введение ноопепта не влияло на фармакокинетику фексофенадина, что свидетельствует о том, что ноопепт не действует на активность белка-транспортера. Введение мексидола в течение 10 дней кроликам вызывало достоверное ($p < 0,05$) увеличение максимальной концентрации фексофенадина на 47,0 %, AUC_{0-24} — на 86,5 % и уменьшение кажущегося объема распределения на 58,8 %, что свидетельствует о том, что мексидол является ингибитором Pgp. Введение афобазола в течение 14 дней сопровождалось повышением AUC_{0-24} фексофенадина — на 105,1 % и снижением его общего клиренса на 56,8 % ($p < 0,05$), что является признаком ингибирующего действия препарата на активность Pgp.

Выводы. Нами установлено, что мексидол и афобазол являются ингибиторами Pgp, а ноопепт не влияет на активность белка-транспортера.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект 16-44-620292_p_a).

Регуляция функционирования гликопротеина-Р посредством тестостерона

А.В. Шулькин, И.В. Черных, Е.Н. Якушева,
Н.М. Попова, Д.О. Уткин

ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова»
Минздрава России, Рязань

Введение. Гликопротеин-Р (Pgp) — АТФ-зависимый мембранный белок-транспортер, играющий важную роль в развитии множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток посредством эффлюкса (выведения) химиопрепаратов из клеток наружу. По-

этому поиск лекарственных препаратов, подавляющих активность данного белка-транспортера, является актуальной задачей.

Задачи исследования. Изучение регуляции функционирования Pgp посредством тестостерона.

Материалы и методы. Работа выполнена на кроликах-самцах породы шиншиллы с массой тела 3500–4200 г. В ходе исследования изучали функциональную активность и экспрессию Pgp при орхэктомии, а также при внутримышечном введении тестостерона ундеканата в дозах 12 и 24 мг/кг массы тела. Функциональную активность Pgp на уровне целостного организма определяли по фармакокинетике его маркерного субстрата — фексофенадина. Фексофенадин не подвергается биотрансформации, и его фармакокинетика зависит в основном от активности Pgp. Экспрессию Pgp в печени, почках и тонком кишечнике определяли иммуногистохимически.

Результаты. Показано, что орхэктомия приводила к повышению активности Pgp, что проявлялось изменением фармакокинетики его маркерного субстрата — фексофенадина, а именно: на 7-й день после операции снижением его максимальной концентрации ($C_{\max}$),

на 14-е сутки уменьшением $C_{\max}$ и площади под фармакокинетической кривой концентрация—время (AUC_{0-t}), увеличением общего клиренса (Cl), на 21-й день — снижением $C_{\max}$ и AUC_{0-t} , увеличением Cl. При этом орхэктомия также сопровождалась повышением экспрессии Pgp на 21-й день эксперимента в печени и почках. Введение тестостерона в дозе 6 мг/кг массы тела нормализовало данный показатель.

Установлено, что введение тестостерона в дозах 12 и 24 мг/кг массы тела вызывало снижение функциональной активности Pgp, что проявлялось повышением $C_{\max}$ фексофенадина на 7-е и 14-е сутки, AUC_{0-t} — на 14-е сутки, снижением Cl на 14-е сутки (доза 12 мг/кг), повышением $C_{\max}$ на 7-е сутки, AUC_{0-t} — на 7-е, 14-е и 21-е сутки, и снижением Cl на 7-е и 14-е сутки (доза 24 мг/кг). При этом введение тестостерона в дозе 12 мг/кг массы тела сопровождалось снижением экспрессии Pgp в печени на 14-е и 21-е сутки, в тонком кишечнике — на 7, 14 и 21-е сутки, а в дозе 24 мг/кг массы тела — снижением экспрессии в печени и тонком кишечнике на 7, 14, 21-е сутки.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект 16-04-00320_а).

Постеры

Синтез и биологические испытания конъюгатов паклитаксела для терапии рака предстательной железы

А.П. Бер¹, А.Э. Мачулкин¹, Н.С. Воробьева², С.В. Ковалев¹,
А.Г. Мажуга^{1,2}, Е.К. Белоглазкина¹, В.Э. Котелянский¹

¹ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова», Москва;

²ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС», Москва

Введение. По данным мировой статистики, на 2012 г. рак предстательной железы занимает 2-е место по распространенности среди мужского населения (1,1 млн новых случаев) [1]. Несмотря на широкий спектр подходов к лечению заболевания, ни один из них не позволяет проводить эффективное лечение опухолей, имеющих метастазы. Многие из современных методов лечения обладают спектром побочных действий.

Задачи исследования. Одним из решений данной проблемы является адресная доставка противоопухолевых препаратов. В клетках рака предстательной железы повышена экспрессия простатического специфического мембранного антигена (ПСМА) по сравнению со здоровыми клетками. Существуют несколько малых молекул, селективно связывающихся с ПСМА [2].

Материалы и методы. В настоящей работе были синтезированы и охарактеризованы конъюгаты противоопухолевого лекарства паклитаксел с лигандами, специфично связывающимися с ПСМА. Конъюгаты состояли из 3 фрагментов, один из которых обеспечивал селективное связывание с ПСМА (вектор). Этот фрагмент связан с активным веществом (паклитаксел) углеродным линкером, который обеспечивает высвобождение лекарства внутри клетки. Длина линкера варьировалась от 5 до 10 атомов углерода. Вектор с линкером соединялись амидным или мочевиным фрагментом.

Результаты. Синтезированы 3 конъюгата: 2 — с амидным сочленением и 1 — с мочевиным. Были проведены испытания *in vitro* на клеточных линиях рака предстательной железы LNCaP (ПСМА⁺) и PC3 (ПСМА⁻). Конъюгаты с амидным сочленением показали токсичность, близкую к соответствующим значениям препарата паклитаксел, однако проявили низкую избирательность к ПСМА-экспрессирующей клеточной линии. Конъюгат с мочевиным сочленением показал высокую избирательность по отношению к ПСМА-положительной клеточной линии, но низкую токсичность.

Выводы. Синтезированы 3 конъюгата, строение которых подтверждено спектрами ¹H и ¹³C ЯМР, масс-

спектрометрией высокого разрешения. Также были проведены биологические испытания на линиях клеток LNCaP (ПСМА⁺) и PC3 (ПСМА⁻).

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 14-34-00017).

1. World Cancer Report 2014. International Agency for Research of Cancer, World Health Organisation.
2. Maresca K.P., Hillier S.M., Femia F.J. et al. A series of halogenated heterodimeric inhibitors of prostate specific membrane antigen (PSMA) as radiolabeled probes for targeting prostate cancer. J Med Chem 2009;52(2):347–52.

Поиск *in silico* соединений, активных по отношению к опухолевым клеточным линиям человека, на примере рака молочной железы

В.И. Дубовская, А.А. Лагунин,
П.В. Погодин, В.В. Поройков

ФГБНУ «НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича»,
Москва

Введение. Существование опухолей, резистентных к традиционным терапевтическим воздействиям, требует создания новых лекарств. Несмотря на достигнутый прогресс, тройной негативный рак молочной железы (РМЖ) невосприимчив к существующему лечению.

Задачи исследования. Для поиска соединений, активных по отношению к опухолевым клеточным линиям человека, создан подход к компьютерному прогнозированию цитотоксического действия лекарственныхподобных веществ на опухолевые и неопухолевые клеточные линии человека с помощью многоступенчатого скрининга, основывающегося на предсказании действия низкомолекулярных химических соединений на белки человека и данных моделирования процессов в регуляторных сетях.

Материалы и методы. Перспективные мишени для воздействия на клеточные линии РМЖ человека были отобраны с помощью метода дихотомического моделирования регуляторных сетей. Анализ регуляторных сетей передачи сигнала внутри клетки включает построение путей передачи сигнала в клетке, поиск регуляторов транскрипции потенциальных фармакологических белков-мишеней. QSAR-анализ зависимостей «структура—цитотоксичность», полученных из баз данных ChEMBL, лег в основу прогноза действия низкомолекулярных химических соединений на белки человека. Используя многоступенчатый скрининг *in silico* 1 млн соединений из баз данных коммерчески доступных

химических веществ, мы отобрали соединения для следующего тестирования.

Результаты. Экспериментальная валидация подхода проведена на 49 соединениях, для которых была предсказана цитотоксичность по отношению к 24 клеточным линиям РМЖ и значительно меньшая — по отношению к 31 неопухолевой клеточной линии. Активность в отношении клеточных линий РМЖ MDA-MB-231 и MCF-7 с IC₅₀ 0,8–50 мкМ проявили 8 соединений. Из них у 5 была значительно более низкая активность в отношении фибробластов человека, а 2 соединения показали избирательную цитотоксичность в отношении определенной клеточной линии РМЖ.

Выводы. Разработанный подход [Konova et al., 2015] позволяет выявлять соединения, цитотоксичные в отношении различных типов опухолевых клеточных линий и оказывающих существенно более слабое влияние на неопухолевые клеточные линии, что дает возможность рационального поиска и конструирования новых лекарственных веществ для терапии злокачественных новообразований.

На основании разработанного нами подхода был создан веб-сервис CLC-Pred для прогноза действия химических соединений на опухолевые и неопухолевые клеточные линии человека, доступный по ссылке: <http://www.way2drug.com/Cell-line/>.

Разработка модельной системы рака молочной железы для оценки эффектов селективных агонистов глюкокортикоидного рецептора

Е.М. Жидкова, М.А. Мазин, К.А. Кузин,
Л.Р. Тилова, А.В. Савинкова, О.И. Борисова,
А.Ю. Портянникова, К.И. Кирсанов, М.Г. Якубовская,
Е.А. Лесовая

НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, Москва

Введение. Глюкокортикоиды (glucocorticoids, GC) широко используются в качестве коадъювантов в терапии солидных опухолей, в том числе при лечении рака молочной железы (РМЖ). Однако их применение ассоциируется с худшим ответом на лечение и прогнозом для ряда подтипов РМЖ. Действие GC реализуется путем активации глюкокортикоидного рецептора (glucocorticoid receptor, GR). Активированная форма GR может осуществлять регуляцию генов по 2 механизмам: трансактивации и транскрепрессии. Транскрепрессия обуславливает терапевтические эффекты, в то время как трансактивация ведет к развитию побочных эффектов GC. Перспективным является поиск селективных агонистов GR, избирательно активирующих транскрепрессорный механизм. К классу таких агонистов относится 2-(4-ацетоксиметил)-2-хлор-N-

метилэтиламмоний хлорид, или CpдA, соединение растительного происхождения, выделенное из кустарника *Salsola tuberculiformis*. В предыдущих исследованиях показано, что CpдA конкурирует с GC за связывание с GR, селективно запускает механизм транскрепрессии и проявляет противоопухолевую активность на моделях гемобластозов и рака предстательной железы.

Задачи исследования. Изучение антипролиферативной активности CpдA и сравнение действия CpдA с классическим GC дексаметазоном (Dex) на клеточных моделях РМЖ, а также демонстрация того, что действие CpдA является GR-зависимым.

Материалы и методы. В работе были использованы клетки аденокарциномы молочной железы линий MCF-7 и MDA-MB-231. Путем трансдукции лентивирусным вектором получены сублинии клеток с подавленной экспрессией GR. Для определения уровня экспрессии GR применяли вестерн-блоттинг.

Для проведения эксперимента клетки высевали в 96-луночные планшеты по 2500 клеток на лунку. Каждые 24 ч клетки обрабатывали CpдA или Dex в концентрациях от 0 до 10 мкМ. Измерение плотности клеточной культуры проводили на 2, 4, 6, 8 и 10-е сутки после обработки путем прямого подсчета живых клеток.

Результаты. Продемонстрировано антипролиферативное действие CpдA и Dex на модельные клеточные линии РМЖ. CpдA в концентрации 10 мкМ подавляет пролиферацию клеток линии MCF-7 на 40 %.

Показано, что сублинии клеток с подавленной экспрессией GR невосприимчивы к CpдA и маловосприимчивы к Dex. Таким образом, доказано, что эффект CpдA опосредован исключительно транскрепрессорным механизмом активации GR.

Выводы. Полученные данные свидетельствуют о перспективности дальнейшего исследования действия CpдA на моделях РМЖ.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты № 16-04-014010 и 15-04-04006).

Синтез и исследование антипролиферативной активности имидазо[1,2-α]пиридиновых производных стероидов

А.С. Козлов¹, И.В. Рассохина¹, О.Е. Андреева²,
А.М. Щербаков², Ю.А. Волкова¹

¹ФГБУН «Институт органической химии
им. Н.Д. Зелинского РАН», Москва;

²ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, Москва

Введение. Аналоги стероидных гормонов, содержащие гетероциклические фрагменты, конденсированные или просто связанные со стероидным каркасом, являются наиболее перспективными соединениями

для разработки новых лекарственных препаратов в терапии гормонально зависимых форм рака.

Задачи исследования. Целью настоящей работы стали синтез и изучение антипролиферативных свойств ранее неизвестных классов гибридных имидазо[1,2- α]-пиридиновых производных стероидов эстренового и андростанового рядов.

Материалы и методы. Синтез был реализован с использованием общих приемов тонкого органического синтеза. Доказательство структур лигандов проводили с применением спектроскопии ядерного магнитного резонанса, инфракрасной спектроскопии и масс-спектрометрии. Опухолевые клетки предстательной и молочной желез получены из коллекций ATCC (США) и НИИ цитологии и до проведения экспериментов хранились в криобанке РОНЦ им. Н.Н. Блохина. Активность рецептора эстрогена измеряли с помощью ген-репортерного анализа.

Результаты. Нами был разработан оригинальный подход к синтезу имидазо[1,2- α]пиридиново-стероидных гибридов, основанный на каскадной реакции гетероциклизации ацетиленов с основаниями Шиффа промотируемой солями меди (I, II). Серии производных стероидов ряда андростана и эстрена, содержащие имидазо[1,2- α]пиридиновый фрагмент в 17-м положении, были получены из 17 α -этинилстероидов с выходами от умеренных до хороших. Проведена оценка противоопухолевой активности полученных соединений по отношению к клеткам линий MCF-7, SKBR3, HBL-100, MDA-MB453, MDA-MB231 (рак молочной железы) и LNCaP-LN3, PC3 (рак предстательной железы). Показано, что все они обладают цитотоксичностью по отношению к клеткам рака молочной железы линии MCF-7 со значением $IC_{50} \leq 10$ мкМ. Продemonстрировано, что гибридные имидазо[1,2- α]пиридиновые стероиды являются активными модуляторами рецептора эстрогенов в клетках рака молочной железы.

Выводы. Высокие результаты противоопухолевой активности и обнаруженная способность модулировать эстрогеновый рецептор α делают имидазо[1,2- α]пиридиновые производные стероидов перспективными для дальнейшего углубленного изучения их свойств и механизмов действия.

Оценка перспектив использования для противораковой генной терапии комбинации генов протеазы 3С вируса гепатита А человека и гибридного белка FCU1

А.А. Комиссаров, И.В. Демидок, Д.Р. Сафина, М.П. Рошина, А.В. Шубин, Н.А. Лунина, М.А. Карасева, С.В. Костров
ФГБУН «Институт молекулярной генетики РАН», Москва

Введение. Разработка генно-терапевтических лекарственных средств на сегодняшний день интенсивно проводится во всем мире. Однако, несмотря на огромный потенциал, генетическая терапия пока имеет весьма ограниченное применение, что связано с наличием ряда нерешенных проблем. Одной из основных причин низкой эффективности противораковых генно-терапевтических препаратов является ограниченность их действия на определенные типы опухолей или даже определенные типы клеток внутри опухоли. Для преодоления этой ограниченности может быть применен подход, основанный на комбинировании терапевтических генов, продукты которых обладают различными механизмами действия. В рамках данной работы нами впервые была исследована комбинация гена протеазы 3С вируса гепатита А человека и суицидальной системы, состоящей из гена слитого белка дрожжевых цитозиндезаминазы/фосфорибозилтрансферазы (FCU1) и пролекарства 5-фторцитозина (5-ФЦ).

Результаты. Для обеспечения коэкспрессии 3С и FCU1 была получена бицистронная конструкция, в которой между генами введена последовательность 2А-пептида вируса болезни Тешена свиней. Для оценки цитотоксического действия использовали линии клеток человека HEK293 и HeLa. Установлено, что цитотоксическое действие FCU1 и протеазы 3С проявляется по-разному. При индивидуальном действии FCU1/5-ФЦ количество жизнеспособных клеток в культуре уменьшалось постепенно, и максимальный эффект наблюдался к моменту окончания эксперимента — 168 ч после трансфекции (п. т.). Наибольший эффект 3С, напротив, был обнаружен в первой экспериментальной точке (24 ч п. т.), а затем количество жизнеспособных клеток увеличивалось и практически сравнивалось с контролем. Комбинация же генов FCU1 и 3С в составе бицистронной конструкции приводила к суммированию цитотоксических эффектов: клетки погибали быстрее, чем при действии только FCU1, и более полно, чем в случае одной протеазы 3С. В то же время значимой синергии не наблюдали.

Выводы. Полученный результат демонстрирует, что интеграция генно-терапевтических систем, вызывающих клеточную гибель и обладающих различными механизмами действия, не препятствует проявлению цитотоксического эффекта каждой из них. Это позво-

ляет предполагать, что спектр действия исследованной комбинации на опухолевые клетки будет более широким, чем в случае индивидуального применения ЗС и FCU1.

*Работа выполнена
при финансовой поддержке РФФ
(грант № 14-14-00526).*

Оценка эффективности фотосенсибилизатора группы бискарбоцианиновых красителей для фотодинамической терапии опухолей

В.А. Кузьмин¹, А.А. Костюков¹, А.Ш. Радченко¹,
А.А. Штиль², Ф.А. Farzad Lahiji¹

¹ФГБУН «Институт биохимической физики
им. Н.М. Эмануэля РАН», Москва;

²НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, Москва

Введение. В настоящее время развитие фотодинамической терапии в значительной степени ограничено небольшим количеством допущенных к применению фотосенсибилизаторов, что вызвано не только проблемой их адресной доставки и активации, но и эффективности, а также безопасности. Бискарбоцианиновые красители обладают рядом достоинств: активируются в дальней инфракрасной области спектра, малотоксичны, проникают во все компартменты клетки.

Задачи исследования. Оценка скорости проникновения и фотоцитотоксичности 2,6-бис-(3,7-ди-N-метил-бенз[1,2-d:4,3-d']бистиазол-)-[N-метил-3,3'-диметил-индокарбоцианина]перхлората (БКЦ) в клетках карциномы прямой кишки человека линии НСТ116. Определение эффективности связывания БКЦ с основным белком крови — человеческим сывороточным альбумином (ЧСА).

Материалы и методы. Выполняли конфокальную флуоресцентную микроскопию, МТТ-тест, абсорбционную и флуоресцентную спектроскопию.

Результаты. Максимальное содержание БКЦ в клетках (флуоресценция экстракта в ДМСО) достигается через 1 ч инкубации и снижается в 2 раза через 24 ч. БКЦ распределен в цитоплазме и присутствует в ядре по данным флуоресцентной конфокальной микроскопии. После 1 ч инкубации с БКЦ (1 мкМ) и замены культуральной среды интенсивность флуоресценции красителя (Ex 514 нм/Em 650 нм) на конфокальных изображениях возрастает через 3 ч. Вероятно, через 3 ч после интернализации БКЦ в составе комплексов с ЧСА среды происходит перераспределение и более прочное связывание с внутриклеточными компонентами, что увеличивает эффективность

флуоресценции. Константа связывания БКЦ с ЧСА составляет $(5,8 \pm 0,4) \text{ E-4 M}^{-1}$. По данным 24 ч МТТ-теста максимальная световая цитотоксичность БКЦ достигается при освещении через 3 ч после инкубации с красителем. Световая цитотоксичность БКЦ составляет 100 % при концентрациях 0,1–1,0 мкМ, не обладающих темновой токсичностью в условиях эксперимента.

Выводы.

- БКЦ эффективно проникает в цитоплазму и ядро клеток НСТ-116 в течение 1 ч после введения в инкубационную среду.
- Сравнительно невысокая константа связывания БКЦ с ЧСА и рост флуоресценции свидетельствуют об образовании более прочных комплексов БКЦ с внутриклеточными компонентами через 3 ч после инкубации.
- БКЦ является перспективным агентом для фотодинамической терапии опухолей, обладающим высокой фототоксичностью в малых и безопасных концентрациях (0,1–1,0 мкМ).

Пептидные аналоги соматостатина, содержащие адамантановый фрагмент

Н.И. Моисеева¹, Д.С. Хачатрян², А.В. Колотаев²,
А.Н. Балаев³, К.А. Охманович³, Е.А. Ручко³

¹ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва;

²ФГУП «ИРЕА», Москва;

³АО «Фарм-Синтез», Москва

Введение. Аналоги соматостатина в настоящее время широко применяются в диагностике и лечении различных нейроэндокринных раковых заболеваний. Такие пептидные препараты, как октреотид и ланреотид, с успехом используются в медицинской практике. Исследования в области синтеза новых пептидных аналогов соматостатина постоянно расширяются. Одним из перспективных направлений является поиск активных соединений в области коротких линейных пептидов с различными функциональными заместителями.

Задачи исследования. Синтез и исследование цитотоксической активности новых линейных пептидов — аналогов соматостатина — содержащих адамантановый фрагмент.

Материалы и методы. В РОНЦ им. Н.Н. Блохина создан и проходит клинические исследования препарат цифетрелин — защищенный пентапептид, аналог соматостатина. Ранее было показано, что наличие адамантансодержащих фрагментов в пептидах приводит к усилению противоопухолевой активности на резистентных к лекарственным препаратам линиях опухолевых клеток. Объектами наших исследований являются модифицированные линейные пентапептиды,

производные цифетрелина, имеющие в составе адамантановые фрагменты.

Результаты. Разработаны методы синтеза и получены модифицированные пентапептиды с объемными амидными заместителями на С-конце. В частности, получены адамантансодержащие амиды: 1-адамантиламид, N-1-(1-адамантил)этиламин. Исследована цитотоксическая активность полученных соединений на линиях клеток аденокарциномы молочной железы MCF-7, аденокарцином предстательной железы человека LNCap, LNCapLN3 и PC-3, карциномы толстой кишки HCT-116, Т-клеточного лимфобластного лейкоза Jurkat и карциномы легкого A549. В качестве контрольных нормальных клеток использовали линию эмбриональных фибробластов человека ФЭЧ. Синтезированные пептиды проявили цитотоксическую активность со значениями IC50 (ингибирующая концентрация, вызывающая гибель 50 % клеток) в микромолярном диапазоне. Наиболее активный пептид обладает значительной цитотоксической активностью на всех линиях раковых клеток, причем для клеток HCT-116 наблюдается высокая селективность цитотоксического действия: IC50 (ФЭЧ)/IC50 (HCT-116) = 6,5.

Выводы. Найдены новые активные модифицированные пентапептиды, аналоги соматостатина, проанализирована зависимость «структура–активность», определены направления дальнейшей оптимизации структуры пептидов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России (соглашение № 14.576.21.0044 от 05.08.2014).

Новый ингибитор рецепторов PD-1 и Tim-3 и его комбинация с лучевой терапией повышают эффективность виротерапии рака

С.Б. Оникиенко¹, В.А. Черешнев², А.В. Земляной¹, Н.В. Бычкова³, В.Ю. Кравцов⁴, В.В. Лищенко³, С.В. Абкин^{4,6}, А.Ф. Панфиленко⁵, И.В. Гужова⁶, Б.А. Маргулис⁶

¹ФГБОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» Минобороны России, Санкт-Петербург;

²ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет им. Б.Н. Ельцина», Екатеринбург;

³ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никифорова», Санкт-Петербург;

⁴ГАОУ ВО ЛО «Ленинградский государственный университет им. А.С.Пушкина», Санкт-Петербург;

⁵ФГБУ «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий» Минздрава России, Санкт-Петербург;

⁶ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург

Введение. Ингибиторы блокирующих противоопухолевый иммунный ответ рецепторов PD-1 и Tim-3 повышают эффективность виротерапии рака. Экзогенный белок теплового шока 70 (БТШ-70) и ионизиру-

ющее излучение мобилизуют эндогенный БТШ-70 из клеток опухоли и усиливают целевой иммунный ответ.

Задачи исследования. Оценить эффективность ингибитора рецепторов PD-1 и Tim-3 — экзогенного БТШ-70 — и его комбинации с позитронной терапией при виротерапии рака.

Материалы и методы. Онколитический вирус Сендай (CeV) вводили внутрикожно (10^7 – 10^8 вирусных частиц) 8–12 раз еженедельно больным ($n = 43$) метастатическим раком. При высоком уровне $CD3^+CD8^+PD-1^+$ (> 40 % от клеток $CD3^+CD8^+$) ежедневно вводили внутривенно 0,5–1,0 мг БТШ-70 на протяжении 7 сут, затем определяли в периферической крови и опухолевых инфильтратах число клеток $CD3^+CD8^+PD-1^+$ и $CD3^+CD8^+PD-1^+TIM-3^+$. Позитронсодержащий радиофармпрепарат (конъюгат ^{11}C с холином) вводили в дозе 250–400 МБк 1 раз в 7–14 сут в комбинации с БТШ-70 и CeV. Критерии эффективности виротерапии — регрессия опухоли, выраженность цитопатических изменений в раковых клетках, уровень гранзима и перфорина в Т-лимфоцитах.

Результаты. Методом проточной цитометрии установлено, что введение БТШ-70 опухоленосителям снижает число клеток $CD3^+CD8^+PD-1^+$ в периферической крови в 1,6–2,7 раза, $CD3^+CD8^+PD-1^+TIM-3^+$ — в 8,2–10,5 раза ($p < 0,05$). Методом иммуноцитохимии выявлено, что число лимфоцитов без рецепторов PD-1 увеличивается в опухолевом инфильтрате более чем в 3 раза, в них повышается уровень гранзима и перфорина, активируются иммунные механизмы гибели опухолевых клеток. Эффективность виротерапии рака повышается при ее комбинации с введением БТШ-70 и позитронной терапии.

Выводы. Двойной ингибитор рецепторов PD-1 и Tim-3 — БТШ-70 — повышает эффективность виротерапии рака. Противоопухолевый иммунный ответ усиливается при его комбинации с позитронной терапией.

Нуклеолин/С23 и нуклеофозмин/В23 как потенциальные мишени для противоопухолевой терапии

Д.А. Понкратова¹, А.А. Лушникова¹, И.С. Абрамов², Л.Ф. Морозова¹, С.М. Андреев³, Е.Ю. Рыбалкина¹

¹ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва;

²ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН», Москва;

³ФБГУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства России, Москва

Введение. Нуклеолин/С23 и нуклеофозмин/В23 — ключевые регуляторы клеточного цикла, транскрипции и трансляции, биогенеза рибосом, молекулярного транспорта и сигналинга в клетке. Высокий уровень экс-

прессии C23 и B23 на мембране, в цитоплазме и в ядре клеток целого ряда опухолей позволяет рассматривать эти белки в качестве возможных мишеней для ингибиторов клеточной пролиферации. Для индукции избирательной гибели опухолевых клеток перспективны некоторые катионные пептиды (КП) — возможные лиганды мембранного C23, которые имеют дендритную структуру, устойчивы к внутриклеточной деградации и в рабочих концентрациях нетоксичны для нормальных клеток.

Задачи исследования. Анализ цитотоксической активности КП в отношении клеток меланомы кожи, рака яичников и глиобластомы человека.

Материалы и методы. Для изучения цитотоксической активности на культурах клеток меланомы кожи линий melLS, melH, рака яичников линии RYa и 2 штаммов глиобластомы линий Glb-Sh и Glb-17 использовали 3 КП с дендритной структурой и 1 КП, меченый нетоксичным флуоресцентным красителем C-5, полимеразную цепную реакцию (ПЦР) с праймерами к ранее картированным «горячим» точкам этих генов с последующим конформационно-чувствительным электрофорезом в полиакриламидном геле и прямым секвенированием ампликонов с измененной структурой ДНК (полиморфные варианты или мутации). Уровень экспрессии генов *NPM/NCL/Trp53* определяли с помощью ПЦР с обратной транскрипцией, белков — с помощью вестерн-блоттинга.

Результаты. В клетках изучаемых линий уровень экспрессии B23/C23 по сравнению с клетками в группе контроля был выше в 3,5/4,6–6,2/8,2 раза в зависимости от линии. Через 3 суток инкубации опухолевых клеток с немечеными пептидами уровень экспрессии матричной РНК (мРНК) *NPM/NCL* снизился в 1,5/1,1–2,1/3,6 раза. В то же время уровень экспрессии мРНК *Trp53* повысился в 1,8–3,5 раза. С помощью МТТ-теста и посредством окрашивания клеток после инкубации с КП красителем Хекст 33342, трипановым синим и йодистым пропидием выявлены апоптотные ядра. Установлена токсичность КП для всех исследованных линий опухолевых клеток. С учетом результатов вестерн-блоттинга избирательная токсичность КП может быть связана с взаимодействием C23/B23/p53, инактивацией p53 и конкурентным связыванием КП с C23 и последующей активацией p53.

Выводы. Исследована цитотоксичность одного из КП с дендримерной структурой молекулы. Выявлена избирательная гибель клеток в культурах меланомы кожи, глиобластомы, рака яичника, но не в культуре подкожных фибробластов человека. Обсуждаются возможные механизмы избирательной цитотоксичности КП с участием шаперонов B23/C23 и p53.

Пептидный фрагмент белка теплового шока Hsp70 ингибирует его шаперонную активность и увеличивает противоопухолевую активность доксорубина

Д.В. Сверчинский, В.Ф. Лазарев, А.Д. Никитина,
И.В. Гужова, Б.А. Маргулис

ФГБУН «Институт цитологии РАН»,
Санкт-Петербург

Введение. Важную роль в защите опухолевой клетки играет молекулярный шаперон Hsp70 (heat shock proteins 70), поддерживающий белки в нативной конформации. В нормальных клетках уровень Hsp70 небольшой, однако в малигнизированных клетках его экспрессия значительно повышается, что является фактором снижения эффективности противоопухолевой терапии. Для того, чтобы усилить действие противоопухолевых агентов, необходимо подавить защитную систему трансформированной клетки, основанную на Hsp70.

Задачи исследования. Многие вещества, ингибирующие Hsp70 и исследуемые в качестве противоопухолевых средств, обладают высокой токсичностью и низкой стабильностью. В то же время пептиды зачастую обладают хорошей пенетрирующей способностью и стабильностью, а также менее токсичны. Поэтому целью нашей работы стал поиск пептидов, способных влиять на его шаперонную активность, и изучение цитотоксического эффекта таких пептидов в комплексе с противоопухолевыми препаратами.

Материалы и методы. Сначала мы провели скрининг пептидов — фрагментов Hsp70 — в целях поиска ингибиторов функции Hsp70 с помощью тестов на узнавание и рефолдинг субстратного белка. Выявленные ингибиторы мы проверяли на способность уменьшать протеолиз Hsp70, указывающую на возможность таких соединений связываться с Hsp70.

Далее методами иммунофлуоресцентной микроскопии и проточной цитометрии мы изучили способность пептидов—ингибиторов Hsp70 проникать во внутриклеточное пространство.

Наконец, мы оценили цитотоксический эффект пептидов на опухолевые клетки в сочетании с доксорубином в опытах по измерению динамического сопротивления и тестах по оценке активности внеклеточной лактатдегидрогеназы.

Результаты. В ходе нашей работы мы выявили пептиды, подавляющие шаперонную функцию Hsp70. Один из этих пептидов, ICit-2, уменьшает эффективность протеолиза Hsp70, что подтверждает его взаимодействие с данным шапероном.

Потенциальный терапевтический пептид должен обладать способностью проникать во внутриклеточное пространство. Пенетрирующие свойства пептида ICit-2

мы подтвердили в опытах на клетках эпидермоидной карциномы человека линии A431.

Наконец, мы продемонстрировали дозозависимый эффект стимуляции цитотоксических свойств доксорубина данным пептидом. При этом ICit-2 не показал собственной цитотоксичности.

Выводы. Нами был найден пептид, подавляющий активность Hsp70 и усиливающий действие доксорубина. В отличие от многих других потенциальных терапевтических средств, ингибирующих Hsp70, ICit-2 не обладает собственной токсичностью в рабочих концентрациях, что делает его возможное фармакологическое применение более безопасным.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 14-50-00068).

Роль дефектов интерферона 1-го типа в вирусном онколизе

Д.А. Серяк

ФГБУН «Институт молекулярной биологии
им. В.А. Энгельгардта РАН», Москва

Введение. Вирусный онколиз представляет собой перспективный метод биотерапии злокачественных новообразований. Онколитические вирусы способны вызывать избирательную гибель опухолевых клеток. Однако некоторые типы опухолей остаются резистентными к виротерапии, что частично обусловлено механизмами врожденного противовирусного иммунитета, опосредованного интерфероном 1-го типа.

Задачи исследования. Проведение широкого скрининга модельных раковых линий на чувствительность к интерферону, выявление линий, чувствительных к вирусной инфекции, с нарушенными механизмами противовирусной защиты.

Материалы и методы. В скрининге раковых линий на наличие нарушений в компонентах противовирусной системы защиты использовали стандартный метод оценки чувствительности клеток к заражению вирусом везикулярного стоматита при добавлении экзогенного интерферона. Протестированы модельные линии различных типов злокачественных опухолей, среди которых — глиобластомы, рак легкого, поджелудочной и предстательной желез, остеосаркома.

Результаты. Проанализирована панель модельных клеточных линий различных типов рака на чувствительность к интерферону. Выявлены раковые линии с нарушенными механизмами противовирусной защиты. Клеточные линии с подавлением белка-адаптера MAVS методом РНК-интерференции — важнейшего компонента интерфероновой системы — показали повышенную чувствительность к вирусу по сравнению с опухолевыми линиями того же гистологического типа, но без ингибирования MAVS.

Выводы. Полученные предварительные результаты подтверждают, что опухолевые линии обладают различной чувствительностью к вирусной инфекции и это, отчасти, может быть связано с разной способностью раковых клеток поддерживать противовирусный иммунный ответ. Отобранные в ходе скрининга клеточные линии будут использованы для дальнейшего детального изучения дефектов интерфероновой системы в опухолевых клетках различных типов.

Подходы к лечению саркомы тучных клеток вирусом Сендай

А.С. Сидоренко¹, А.В. Терешкова¹, Е.А. Мухина²,
Г.В. Ильинская^{3,4}

¹ФГБУН «Институт молекулярной биологии
им. В.А. Энгельгардта РАН», Москва;

²Клиника онкологии животных ФГБУ «Московский
научно-исследовательский онкологический институт
им. П.А. Герцена» — филиал ФГБУ НМИРЦ
Минздрава России, Москва;

³НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОИЦ им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, Москва;

⁴ФГБУ «Российский научный центр медицинской реабилитации
и курортологии» Минздрава России, Москва

Введение. Несмотря на значительные успехи, достигнутые в лечении онкологических заболеваний, злокачественные опухоли остаются одной из основных причин смертности во всем мире. Вирусный онколиз представляет собой принципиально новый подход к терапии этих заболеваний, основанный на естественной способности некоторых вирусов селективно убивать опухолевые клетки, не повреждая здоровые ткани. Одним из представителей таких вирусов является парамиксовирус Сендай, непатогенный для человека, кошек и собак, но вызывающий респираторную инфекцию у мышей.

Задачи исследования. Изучить онколитическую активность вируса Сендай на модели тучноклеточной саркомы собак и кошек.

Результаты. В качестве модели мы выбрали мастоцитому (злокачественную саркому тучных клеток) — часто встречающуюся опухоль у собак и кошек и имеющую очень плохой прогноз (более чем в 70 % случаев). В предварительных экспериментах *in vitro* мы показали, что опухолевые клеточные линии человека и животных различного гистогенеза, в том числе первичные опухолевые линии, обладают избирательной чувствительностью к вирусу Сендай, а также обеспечивают различный уровень образования вирулентных частиц.

Нами были пролечены 27 животных (22 собаки и 5 кошек) с диагнозом мастоцитомы различной дифференцировки и разной степени злокачественности. Из них 14 животных были прооперированы с недостаточным захватом здоровых тканей. Были апробированы как схемы лечения вирусом (в монорежиме или в комбинации с хирургическим вмешательством), так

и различные способы введения вакцины. Независимо от способа введения вируса полная или частичная ремиссия была достигнута в 82 % случаев. Длительность ремиссии была 3–31 мес (по настоящее время), максимальная продолжительность жизни — 21–38 мес (по настоящее время). С начала лечения вирусом у животных наблюдалось улучшение общего самочувствия.

Выводы. Таким образом, мы показали, что вирус Сендай является перспективным онколитиком и может быть использован как альтернатива адъювантному лечению, в ряде случаев заменить хирургическое вмешательство при мастоцитамах, а возможно и при других опухолях. Клинически значимых побочных эффектов не отмечено.

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (грант № 14-15-01073).

Молекулярные механизмы противоопухолевого действия терапевтически приемлемого аналога оливомидина А

В.В. Татарский¹, А.Н. Тевяшова², А.К. Исагулиева¹,
А.А. Штиль¹

¹ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва;

²ФГБНУ «НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе», Москва

Введение. Оливомидин А (1) — антибиотик группы ауреоловой кислоты. Высокая цитотоксичность 1 для опухолевых клеток сопровождается неприемлемой общерезорбтивной токсичностью.

Задачи исследования. Создать производные с достаточным терапевтическим «окном», сохраняющие противоопухолевую активность 1. Химические модификации структуры 1, в частности селективное окисление боковой цепи агликона и последующее амидирование промежуточного продукта 1'-дез-(2,3-дигидрокси-н-бутироил)-1'-карбоксиоливомидина, позволили получить N-(2-диметиламиноэтил) амид 1'-дез-(2,3-дигидрокси-н-бутироил)-1'-карбоксиоливомидина (2).

Результаты. Противоопухолевый эффект 2 на моделях трансплантированных опухолей у лабораторных мышей достигнут в дозах, переносимых животными, что позволяет расценивать 2 как кандидата в лекарственные средства. В настоящем исследовании изучены механизмы действия 2 (в сопоставлении с 1) на культурах опухолевых клеток млекопитающих. Соединение 2 вызывало гибель опухолевых клеток различного гистогенеза (аденокарциномы молочной железы MCF-7, яичника SKOV-3, толстой кишки SW620 и HCT-116, рака легкого H460 и H1299, гемобластозов HL-60, Jurkat, K562, мягкотканых сарком MCH-7, Wehi-164, U2OS) в наномолярных концентрациях. Гибель сопро-

вождалась нарастанием доли апоптотических клеток (по данным проточной цитофлуориметрии с аннексином V и пропидия йодидом) после 48–72 ч инкубации. Исследование распределения фаз клеточного цикла показало, что 2 (100 нМ) блокирует клетки в G1 и G2/M. При более высоких концентрациях (1 мкМ) клетки задерживаются в фазе репликации. Задержка клеточного цикла сопровождалась снижением содержания циклина D1 и c-Мус, однако экспрессия ингибиторов циклинзависимых киназ (p21, p27, p18) не увеличивалась, что позволяет использовать препарат на линиях клеток с инактивирующими мутациями этих белков.

Выводы. Сравнимая противоопухолевая активность при снижении общей токсичности позволяет рассматривать соединение 2 в качестве перспективного лекарственного кандидата для терапии.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы «Фарма-2020» Правительства РФ (государственный контракт № 14. N08.12.0058 от 11.11.2015).

Синтез и противоопухолевые свойства новых производных β-карболина

Д.С. Хачатрян¹, А.В. Колотаев¹, М.А. Барышникова²,
В.Н. Осипов^{1,2}, К.Р. Матевосян³

¹ФГУП «ИРЕА», Москва;

²НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва;

³ФГБОУ ВО «Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева», Москва

Введение. В литературе широко известны β-карболины, к классу которых относятся некоторые природные соединения, например алкалоиды, проявляющие мультиактивность (противомалярийную, противовирусную, противогрибковую и противоопухолевую [1–3], как например, гармин [4]). Исследования в области синтеза новых производных карболина постоянно расширяются, в связи с этим разработка методов синтеза новых производных, изучение их противоопухолевой активности представляются актуальной задачей.

Задачи исследования. Для поиска новых цитостатиков потребовалось получить ряд производных β-карболина из триптамина по реакции Пикте—Шпенглера с учетом ранее синтезированных нами нескольких ароматических альдегидов, несущих разнообразные фармакофорные гетероциклические заместители, полученных заменой атома хлора различными O-, N-, S-нуклеофилами (фенолы, вторичные амины, тиолы) [5].

Материалы и методы. Все полученные соединения охарактеризованы протонным магнитным резонансом, масс-спектрами и элементным анализом. Для оценки противоопухолевой активности использовали МТТ-тест.

Исследование проводили на клеточных линиях опухолей человека: карциномы толстой кишки HCT-116, карциномы предстательной железы PC-3, карциномы легкого A549, аденокарциномы молочной железы MCF-7, Т-клеточного лимфобластного лейкоза Jurkat, полученных из Банка клеточных линий РОНЦ им. Н.Н. Блохина. Активными считали соединения, у которых IC₅₀ (ингибирующая концентрация, вызывающая гибель 50 % клеток) была ≤ 100 мкМ.

Результаты. Разработаны препаративные методики получения карболинов, содержащих гетероциклические фармакофорные заместители. Активность обнаружена у всех соединений. В концентрации 100 мкМ цитотоксичность > 82 % показали 12 соединений. В концентрации 10 мкМ на всех линиях клеток цитотоксичностью > 80 % обладали 10 соединений, а 2 соединения были цитотоксичны на 56–75 %. В концентрации 1 мкМ активность не обнаружена.

Выводы. На основе результатов анализа зависимости структура–активность были выбраны 4 наиболее перспективных соединения для дальнейших исследований.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Минобрнауки России (соглашение № 14.576.21.0044 от 05.08.2014).

1. Chourasiya R.K. et al. Med Chem Res 2013;22(6):2991–3001.
2. Wu W. et al. Antimicrob Agents Chemother 2015;59(1):356–64.
3. Daoud A. et al. Eur J Pharmacol 2014;724:219–30.
4. Chen Q. et al. Int J Cancer 2005;114(5):675–82.
5. Хачатрян Д.С. и др. Известия РАН. Серия химическая 2015;(2):395–404.

Влияние димерных бисбензимидазолов, содержащих пиперазиновый цикл в линкере, на метилирование ДНК в клетках рака молочной железы

Д.А. Храброва¹, Е.С. Громова¹, Н.Н. Вейко², В.Н. Ташлицкий¹, С.В. Костюк², М.А. Кваша¹, А.Л. Жузе³, В.С. Коваль³, Е.С. Ершова², А.А. Иванов⁴

¹ФГБОУ ВО «МГУ им. М.В. Ломоносова», Москва;

²ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», Москва;

³ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН», Москва;

⁴ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва

Введение. Метилирование ДНК, осуществляемое ДНК-метилтрансферазами (МТаз), — одна из наиболее активно изучаемых эпигенетических модификаций, играющая важную роль в контроле экспрессии генов в клетках эукариот. В нормальных клетках создается свой профиль метилирования, однако в раковых клетках наблюдается гиперметилирование CpG-островков в промоторных областях генов-супрессоров опухолей.

Ингибиторы МТаз вызывают реактивацию этих генов, что позволяет их использовать в противоопухолевой терапии. Ранее в качестве ингибиторов МТаз нами были сконструированы димерные бисбензимидазолы с пиперазиновым циклом в олигометиленовом линкере между бисбензимидазольными фрагментами, DBP (*n*) (*n* — число метиленовых звеньев) [1]. Эти соединения растворимы в воде, и в микромолярных количествах ингибируют прокариотическую МТазу M.SssI.

Задачи исследования. Изучение влияния DBP (1–4) на метилирование ДНК в клетках рака молочной железы MCF-7. Исследовать проникновение DBP (1–4) в раковые клетки, оценить влияние DBP (1–4) на общий уровень метилирования геномной ДНК и степень метилирования промоторных участков нескольких генов, изучить возможность реактивации генов-супрессоров опухолей под действием DBP (1–4).

Материалы и методы. Проникновение DBP (1–4) в клетки MCF-7 анализировали с помощью флуоресцентной микроскопии. Для оценки влияния DBP (1–4) на общее метилирование геномной ДНК использовали иммунофлуоресцентный и иммуноферментный анализы и метод UPLC/MS/MS. Метилирование промоторных областей генов *RARB* и *PTEN* определяли по расщеплению ДНК метилчувствительными эндонуклеазами. За экспрессией генов-супрессоров в клетках MCF-7 в присутствии DBP (1–4) следили, измеряя уровень матричной РНК с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

Результаты. Показано, что DBP (1–4) локализуются, главным образом, в ядрах раковых клеток. Эти соединения были обнаружены также в митохондриях; их влияния на окислительный стресс не наблюдалось. Продemonстрировано, что DBP (1–4) оказывают небольшой деметилирующий эффект на геномную ДНК в клетках MCF-7. Обнаружена способность DBP (1–4) уменьшать степень метилирования промоторных областей генов-супрессоров опухолей *RARB* и *PTEN*. Соединения DBP (2) и DBP (4) способствуют реэкспрессии генов *CDKN2A* и *RUNX3*, а DBP (1) — генов *CDKN2A*, *Apaf-1*, *RUNX3*, *APC* и *RARB*, «молчащих» в клетках MCF-7 из-за гиперметилирования промоторных областей.

Выводы. DBP (*n*), возможно, в дальнейшем могут быть использованы для подавления роста опухолей.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 6-04-01087).

1. Ivanov A.A., Koval V.S., Susova O.Yu. et al. DNA specific fluorescent symmetric dimeric bisbenzimidazoles DBP (*n*): the synthesis, spectral properties, and biological activity. Bioorg Med Chem Lett 2015;25(13):2634–8.

Синтез и оценка антипролиферативной активности аналогов комбретастина А-4

Л.В. Яминова¹, В.З. Ширинян², А.В. Ядыков¹, А.И. Маркосян³

¹ФГБОУ ВО «Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева», Москва;

²ФГБУН «Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН», Москва;

³Научно-технологический центр органической и фармацевтической химии НАН РА, Ереван

Введение. Несмотря на существенный прогресс, достигнутый за последние десятилетия в разработке новых противоопухолевых препаратов, современная онкологическая наука и медицинская химия по-прежнему сталкиваются с проблемами контроля и лечения злокачественных опухолей человека. Одним из важных молекулярных мишеней для противоопухолевых препаратов является клеточный белок тубулин, обладающий уникальной способностью связывать низкомолекулярные лиганды. Среди таких лигандов, способных

связываться с колхициновым сайтом тубулина и ингибировать пролиферацию раковых клеток, особое место занимают аналоги комбретастина А-4, представляющие собою цис-стильбены, содержащие в качестве арильных остатков в основном метокси-производные ароматических и гетероароматических соединений.

Задачи исследования. Синтез и оценка противоопухолевой активности новых аналогов комбретастина А-4. Был синтезирован широкий ряд триарилдивинилкетонов 2 и на его основе получены производные циклопентенона 3 и дигидронафталина 4.

Материалы и методы. Применили общие методы органического синтеза, ядерного магнитного резонанса, масс-спектрометрию, МТТ-тест.

Результаты. Для оценки биологической активности проведено тестирование синтезированных соединений на 4 линиях опухолевых клеток человека: Т-клеточного лейкоза (Jurkat), карциномы легких (A549), рака кишечника (HCT-116) и аденокарциномы молочной железы (MCF-7).

Выводы. Проведена оценка как исходных дивинилкетонов, так и продуктов реакции, которая показала, что последние менее активны, чем исходные соединения.

Тезисы

Аминокислотный состав нового комплекса биологически активных веществ эриксин для лечения эстроген-негативных форм рака молочной железы

А.А. Абдувалиев¹, А.Х. Рахманов¹, F.W. Wang²

¹Ташкентская медицинская академия, Ташкент;

²Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, China, Chengdu

Введение. Эриксин — водный раствор комплекса биологически активных веществ (полипептидов и свободных аминокислот), а также микроэлементов, получаемых из биомассы змей *Eryx*. Препарат обладает биостимулирующим эффектом, повышает сопротивляемость организма к действию повреждающих факторов, оказывает специфическое лечебное действие, способствуя регрессии патологических очагов воспаления, нормализации или существенному улучшению лабораторных и биохимических показателей, а также количественных и функциональных параметров иммунной системы.

Задачи исследования. В целях исследования механизма действия препарата эриксин мы определили аминокислотный состав данного лекарственного средства.

Материалы и методы. Аминокислотный анализ проводили с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографе Agilent Technologies 1200 (США).

Результаты. Проведенные исследования показали, что общее содержание аминокислот в препарате эриксин составляет 1103,482 мкг/г сухого вещества. Наибольшая доля аминокислот приходилась на глутаминовую кислоту (250,5766 мкг/г), треонин (204,1804 мкг/г), валин (109,0255 мкг/г), триптофан (90,44374 мкг/г), пролин (81,18231 мкг/г), лейцин (72,37258 мкг/г), аргинин (53,60088 мкг/г), изолейцин (50,33778 мкг/г), метионин (28,78033 мкг/г).

В настоящее время проводится интенсивное изучение фармакологических свойств аминокислот: исследуются фармакологические свойства фенилаланина, установлены терапевтические эффекты аденозил метионина при депрессии и таурина при коррекции артериального давления, ацетил цистеин анонсирован в качестве гепатопротектора и обнаружено иммуномодулирующее действие лизина, аргинин используется при эндотелиальной дисфункции и заживлении язв кожи, изучается действие аргинина на агрегацию тромбоцитов, расширяется терапевтический потенциал

триптофана и т. д. Также следует отметить воздействие активного деривата метионина (S-Adenosyl-L-methionine, SAME) на метилирование ДНК, что позволяет позиционировать SAME в качестве кандидата для фармакологического управления репарацией ДНК и профилактики неоплазм.

Выводы. Комплекс аминокислот, входящий в состав препарата эриксин, обуславливает его терапевтические свойства и позволяет реализовывать биостимулирующие эффекты, повышать сопротивляемость организма к действию повреждающих факторов. Наличие в комплексе аминокислот метионина может быть использовано в качестве регуляции репарацией ДНК и профилактики неоплазм, что требует в будущем проведения дополнительных исследований.

Подавление экспрессии белковых маркеров эпителиально-мезенхимального перехода и признаков злокачественности в клетках рака кишечника человека низкими дозами противоопухолевых препаратов как один из новых механизмов эффективности низкодозовой метрономной химиотерапии больных раком толстой кишки

Н.А. Безденежных, О.А. Ковалева, А.А. Лихова,
В.Е. Жильчук, Ю.И. Кудряев

Институт экспериментальной патологии,
онкологии и радиобиологии
им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины, Киев;
Ровенский онкологический диспансер, Ровно

Введение. Ранее мы показали, что режим метрономной низкодозовой (НД) терапии химиопрепаратами (ХП), особенно в сочетании с интерфероном альфа (ИФН-α), у пациентов с инкурабельным метастатическим колоректальным раком (мКРР) вызывает в ряде случаев регрессию метастазов в печень и значительно увеличивает их 3-летнюю выживаемость (Онкология, 2011). Одним из механизмов противоопухолевого эффекта метрономной НД терапии ХП было значительное снижение уровня VEGF в крови пациентов.

Задачи исследования. Выяснить характер прямого действия НД терапии ХП на злокачественность опухолевых клеток и их иммунофенотип.

Материалы и методы. Исследовали культуру клеток, применяли иммуногистохимический, цитогенетический и статистический методы. В экспериментах *in vitro* использовали модели клеток линий COLO 205 и HT-29, а также клеток мКРР человека на ранних пассажах (до 20).

Результаты. Мы показали, что прямое продолжительное действие (до 30 сут) НД терапии ХП и ИФН- α *in vitro* в концентрациях в 10–20 раз ниже LD50 модифицирует мезенхимальный фенотип клеток, значительно ингибирует клеточную пролиферацию и колониеобразование в агаре.

Инкубация клеток мКРР с иринотеканом, цисплатином и/или ИФН- α оказывает генотоксическое действие на клетки: значительно уменьшается количество делящихся клеток и клеток с тороподобным ядром, значительно увеличивается число клеток с микроядрами. Важно, что при длительном действии НД терапии ХП клетки мКРР не утрачивают свою чувствительность к ХП в дозах LD50.

Характерным признаком изменений в опухолевых клетках является практически полное подавление экспрессии фактора транскрипции EMT Slug и маркера опухолевых стволовых клеток CD44 при различных комбинациях препаратов. В монорежиме или в комбинации с ХП ИФН- α резко подавлял все признаки EMT.

Выводы. Одним из новых механизмов эффективности метронормальной терапии больных мКРР может быть не только ее антиангиогенный эффект, но и генотоксическое действие НД терапии ХП и реверсия EMT в клетках мКРР с утратой их злокачественности.

Получение и анализ нового пептидного ингибитора Ras-ГТФазы

В.К. Боженко, Т.М. Кулинич

ФГБУ «Российский научный центр рентгенодиагностики»
Минздрава России, Москва

Введение. Белок Ras является одной из ключевых молекул сигнального пути MAPK/ERK, ответственного, в частности, за деление и пролиферацию клеток. Мутации гена *KRAS*, приводящие к гиперактивации сигнального пути MAPK/ERK, встречаются в 25 % всех опухолей человека, что делает *KRAS* одним из наиболее важных онкогенов и, соответственно, мишенью для терапии. Также известно, что мутации *KRAS* делают неэффективной таргетную терапию, направленную на *BRAF*-мутантные формы рака.

Нами была получена оригинальная пептидная последовательность, обладающая ингибирующими свойствами в отношении Ras-ГТФазы.

Задачи исследования. Разработка нового противоопухолевого препарата — пептидного ингибитора Ras-ГТФазы.

Материалы и методы. Пептид был получен методом твердофазного синтеза. Цитотоксическая и цитостати-

ческая активности пептида исследовали *in vitro* на клеточных линиях злокачественных опухолей человека: HT-29, НСТ-116, SCOV, A549, MCF-7 с применением стандартных тестов (MTT-тест, ЛДГ-тест), метода проточной цитофлуориметрии (двойная окраска CFDA-SE/PI и двойная окраска AnnexinV-PI, позволяющие оценить уровень апоптоза), а также с помощью технологии online-мониторинга iCelligence.

Результаты. При оценке влияния последовательности пептидного ингибитора Ras-ГТФазы на культуры клеток с использованием MTT- и ЛДГ-тестов было показано, что количество живых клеток во всех исследованных культурах уменьшается при увеличении концентрации ингибитора Ras-ГТФазы в диапазоне от 2 до 40 мкМ пропорционально внесенной концентрации и мало зависит от типа клеток. Низкие концентрации (2 и 5 мкМ) вызывают обратимый эффект, в то время как концентрации > 10 мкМ оказывают стойкий цитотоксический эффект. Также показано, что внесение в культуральную среду исследуемого пептида приводит к активации апоптоза. Наибольший проапоптотический эффект наблюдался в культурах A549 (аденокарцинома легкого), НСТ-116 и HT-29 (колоректальный рак). С помощью метода оценки жизнеспособности в реальном времени iCelligence показано, что концентрация 20 мкМ приводит к стойкому 100 % торможению пролиферации.

Выводы. Полученные результаты демонстрируют, что сконструированная пептидная последовательность обладает выраженными цитотоксическими и цитостатическими свойствами в отношении клеток злокачественных опухолей различного гистогенеза. При этом IC50 находится в диапазоне 5–20 мкМ и зависит от типа исследуемой культуры.

К механизму цитотоксического действия новых производных трополоновых алкалоидов К-50, К-60, К-61

З.М. Еникеева, А.А. Ибрагимов, А.Ч. Абдирова,
И.В. Карпышева

РОНЦ Минздрава Республики Узбекистан, Ташкент

Введение. Исследования последних лет привели к формированию новых представлений о механизме гибели клеток, имеющих повреждения ДНК. Заметное нарушение систем репарации с отражением в повреждении ДНК приводят клетку к гибели в результате нарушения функций всех биохимических систем из-за невозможности полноценной транскрипции генов, содержащих дефекты в матрице ДНК.

Задачи исследования. Изучение влияния новых производных трополоновых алкалоидов К-50, К-60 и К-61, проявивших высокую противоопухолевую активность, на синтез ДНК, активность топоизомеразы II

и экспрессию мышинового гена лекарственной устойчивости *MDR2* на опухоли саркомы-180 по сравнению с этопозидом.

Материалы и методы. К суспензии клеток опухоли саркома-180 в 96-луночных планшетах добавляли препараты в концентрации 50 (К-50), 70 (К-60) и 22 (К-61) мкг/мл и инкубировали 2 ч при температуре 37 °С и 5 % углекислом газе (CO₂) в CO₂-инкубаторе, количество выделенных ДНК и РНК измеряли на спектрофотометре СФ-26. Межнуклеосомную деградацию ДНК оценивали посредством электрофореза ДНК в 1,5 % агарозном геле. Из опухолевой ткани под воздействием каждого препарата были получены тотальные препараты РНК, затем методом обратной транскриптазы были получены матричные РНК и синтезированы комплементарные ДНК (экспрессия *MDR2*/полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией).

Результаты. Синтез ДНК в опухоли саркомы-180 (*in vitro*) К-50, К-60, К-61 и этопозид ингибировали на 60, 75, 80 и 65 % соответственно. Синтез РНК опухоли К-50, К-60, К-61 и этопозид ингибировали на 70, 65, 70 и 54 % соответственно. Также наблюдается деградация межнуклеосомной ДНК под влиянием изучаемых препаратов на 80–90 %, под действием этопозид — на 70 %. Целостность ДНК зависит от активности топоизомеразы II, которая ингибирована на 55, 60 и 75 % препаратами К-50, К-60, К-61, под действием этопозид — на 55 %. Действие препаратов на экспрессию гена лекарственной устойчивости *MDR2* было следующим: К-50 — 20 %, К-60 — 22 %, К-61 — 15 % по сравнению с повышенным уровнем *MDR2* этопозид (35 %). При исследовании экспрессии опухолевого супрессора p53 опухоли *in vitro*, К-50, К-60, К-61 и этопозид ингибировали экспрессию p53 на 40, 35, 50 и 20 % соответственно.

Выводы. Противоопухолевые препараты К-50, К-60, К-61 способствуют низкому уровню развития множественной лекарственной устойчивости, по-видимому, из-за значительного ингибирования синтеза ДНК и РНК, межнуклеосомной деградации ДНК и активности топоизомеразы II.

*Работа поддержана грантом
Республики Узбекистан ФДСС 12.7.*

К изучению механизма радиосенсибилизирующего действия препаратов К-2 и К-19, полученных из колхамина

Ш.Н. Ибрагимов, А.А. Ибрагимов, З.М. Еникеева,
А.Ч. Абдилова, Н.Б. Юсупова

РОНЦ Минздрава Республики Узбекистан, Ташкент

Задачи исследования. Изучение радиосенсибилизирующего действия новых противоопухолевых пре-

паратов, разработанных в РОНЦ им. Н.Н. Блохина, на животных с опухолями.

Материалы и методы. Опухоли животных облучали на аппарате Theratron мощностью 112 Гр/мин (источник кобальт-60) в тотальной разовой дозе, равной 6 и 3 Гр, а также в дозе 1,5 Гр 4-кратно или 1 Гр 3-кратно, защищая животных свинцовыми пластинами со специальным отверстием. Определяли противоопухолевую активность при однократном и многократном введении препарата совместно с облучением на животных-опухоленосителях. К суспензии клеток опухоли саркома 180 в 96-луночных планшетах добавляли препараты и инкубировали 2 ч при температуре 37 °С и 5 % углекислом газе (CO₂) в CO₂-инкубаторе. Затем количество выделенных ДНК и РНК измеряли на спектрофотометре СФ-26. Межнуклеосомную деградацию ДНК оценивали посредством электрофореза ДНК в 1,5 % агарозном геле. Из опухолевой ткани под воздействием каждого препарата были получены тотальные препараты РНК, затем методом обратной транскриптазы были получены матричные РНК и синтезированы комплементарные ДНК (экспрессия *MDR2*/полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией).

Результаты. При изучении на животных с опухолями препаратов К-2 и К-19 совместно с облучением найден режим их применения (доза, время введения до облучения и в схемах) при однократном и многократном введении. На мышах с саркомой-180 и солидной опухолью Эрлиха наибольшую активность препараты проявляют при воздействии за 16 ч до облучения, которая превышает действие облучения 4,5 и 6,0 Гр на 20–26 % при снижении уровня побочных эффектов облучения. Снижение дозы облучения до 3 Гр способствует потенцированию действия облучения на 60 %.

Выводы. Изученный эффект объясняется механизмом действия препаратов К-2 и К-19 — способностью воздействовать на синтез ДНК (фаза S) и синхронизировать клетки в фазе M + G₂, что показано цитофлуориметрическим методом и приводит к дальнейшему повреждению их облучением. Кроме того, способность препаратов снижать активность топоизомеразы II, которая ингибирована на 63 и 75 %, объясняет их более выраженное противоопухолевое и радиосенсибилизирующее действие.

*Работа поддержана грантом
Республики Узбекистан АДСС 15. 9.4.*

Доклиническое изучение токсичности нового противоопухолевого лекарственного средства – гликозидного производного индолакарбазола – ЛХС-1208

А.А. Николина, Н.Ю. Кульбачевская, О.И. Коняева,
В.А. Чалей, Н.П. Ермакова, В.М. Бухман

ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва

Введение. ЛХС-1208 — новый противоопухолевый препарат на основе гликозидного производного индолакарбазола, разработанный в РОНЦ им. Н.Н. Блохина.

Задачи исследования. Изучение острой токсичности ЛХС-1208 на мелких животных и субхронической токсичности на крысах и собаках.

Материалы и методы. Работа проведена на 276 мышах линии В6D2F1 женского и мужского пола, 140 беспородных крысах женского и мужского пола и 4 собаках породы бигл. При изучении острой токсичности мышам препарат вводили однократно внутривенно (в/в) в диапазоне доз 35–175 мг/кг, крысам — 50–125 мг/кг; внутрибрюшинно (в/б) мышам — 50–200 мг/кг, крысам — 60–100 мг/кг. При изучении субхронической токсичности препарат вводили ежедневно 15-кратно крысам в/б в суммарных дозах 50, 100, 200 мг/кг, собакам — в/в в суммарных дозах 20 и 30 мг/кг. Крысы были выведены из эксперимента на 3-е и 30-е сутки, собаки — на 3-е и 60-е сутки.

Результаты. При в/в применении ЛХС-1208 мышам и крысам и при в/б введении крысам гибели животных не наблюдалось. Гибель мышей при в/б применении препарата наступала на 2–4-е сутки на фоне сосудистых нарушений. Расчетные токсические дозы при в/б введении мышам: для самок ЛД₅₀—143 (134–170) мг/кг; для самцов ЛД₅₀—143 (136–159) мг/кг. После в/б применения препарата у мышей и крыс отмечено дозозависимое отставание прироста массы тела по сравнению с приростом массы тела контрольных животных. При изучении субхронической токсичности на крысах установлено, что препарат вызывал морфофункциональные изменения в сердечно-сосудистой системе. Наблюдалось отсутствие половых отличий для мелких лабораторных животных.

В условиях субхронического эксперимента на собаках отмечены внешние проявления интоксикации только после первого введения препарата в течение 5 мин: собаки трясали головой, наблюдались акты дефекации и мочеиспускания, состояние оглушенности, ступора, жажды, сокращение мышц живота, подергивание лап. ЛХС-1208 вызывал недозозависимое уменьшение количества тромбоцитов, оказывал недозозависимое влияние на углеводный обмен, функцию поджелудочной

железы и синтезирующую функцию печени, вызывал количественные и качественные изменения на электрокардиограмме собак. Морфологически в сердце собак, получавших препарат в суммарной дозе 30 мг/кг, на 3-е сутки опыта отмечены выраженные признаки очагового межжелудочного миокардита, не полностью обратимые к 60-м суткам опыта.

Выводы. Установлены лимитирующие виды токсичности для ЛХС-1208: кардиотоксичность, гематотоксичность (тромбоцитопения) и гепатотоксичность.

Трансляционные биохимические маркеры токсичности

Т.В. Осипова, В.М. Бухман

ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва

Введение. Использование трансляционных биохимических маркеров токсичности (ТБМТ) помогает принять правильное решение в ходе исследования, сократить время, снизить затраты, необходимые для разработки новых противоопухолевых препаратов и передачи их в клиническую практику. Традиционно в НИИ ЭДитО РОНЦ им. Н.Н. Блохина применяют ТБМТ, содержащиеся в сыворотке подопытных лабораторных животных.

Задачи исследования. Изучение современного состояния проблемы, связанной с использованием ТБМТ при доклиническом изучении токсичности новых лекарственных форм и комбинаций противоопухолевых препаратов.

Материалы и методы. Анализ современной научной литературы относительно роли ранее известных и вновь открытых ТБМТ.

Результаты. ТБМТ определяются во время доклинических испытаний и применяются на всех этапах исследования. На этапе трансляции результатов доклинических исследований клинический точный подбор ТБМТ необходим для помощи врачам в обеспечении максимальной безопасности пациентов на первых этапах клинических испытаний. ТБМТ должны обладать высокой чувствительностью и специфичностью, легко измеряться в реальном времени в легкодоступных биологических средах, одинаково оценивать процесс у лабораторных животных разных видов и человека, позволять сравнивать результаты клинических исследований с доклиническими. Во избежание ошибочных результатов ТБМТ должны быть тщательно валидированы и квалифицированы. Например, в настоящее время международный консорциум (Predictive Safety Testing Consortium, PSTC) рекомендует при оценке потенциальной нефротоксичности наряду с традиционными сывороточными ТБМТ внедрять панель ТБМТ, содержащихся в моче лабораторных животных (KIM-1, β_2 -микроглобулин, цистатин С, кластерин, ttf-3 и др.).

Эти ТБМТ выявляют ранние структурные поражения в различных отделах нефрона и наряду с традици-

онными маркерами (сывороточный креатинин и азот мочевины крови) должны использоваться для оценки нефротоксичности препаратов.

Заключение. В настоящее время происходит внедрение рациональных комбинаций новых и традиционных ТБМТ в исследования, проводимые в НИИ ЭДиТО РОНЦ им. Н.Н. Блохина.

Бактериохлорины: от вещества до фотосенсибилизатора нового поколения

Е.А. Плотникова¹, М.А. Грин², Е.А. Лукьянец³,
Р.И. Якубовская¹

¹ФГБУ «Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена» — филиал ФГБУ НМИРЦ Минздрава России, Москва;

²ФГБОУ ВО «Московский технологический университет», Москва;

³ФГУП «Государственный научный центр «НИОПИК», Москва

Введение. Метод фотодинамической терапии (ФДТ) активно применяется последние 30 лет в клинической практике при лечении злокачественных новообразований различной локализации. Официальные фотосенсибилизаторы (ФС) имеют спектр поглощения в области 660–685 нм. Проницаемость биологических тканей в этом диапазоне невелика и составляет всего несколько миллиметров, что позволяет лечить только поверхностные опухоли. Поэтому в настоящее время ведутся поиск и разработка новых ФС, поглощаемых в дальней красной и ближней инфракрасной областях спектра.

Задачи исследования. Медико-биологическое изучение субстанций бактериохлоринового ряда, поглощаемых в дальней красной и ближней инфракрасной областях спектра, и отбор высокоэффективной субстанции для создания нового препарата для ФДТ.

Материалы и методы. В качестве ФС исследованы вещества бактериохлоринового ряда природного ($\lambda_{\max} = 750\text{--}805\text{ нм}$) и синтетического ($\lambda_{\max} = 745\text{--}765\text{ нм}$) происхождения. Для отбора эффективной субстанции оценены фото-, физико-химические свойства, фотоиндуцированная активность и темновая цитотоксичность на панели опухолевых клеток различного генеза; способность проникновения и накопления в опухолевых клетках. Изучены динамика накопления красителей в опухолевой ткани и их биораспределение и эффективность ФДТ с ФС у мышей с опухолями S37, Colo26 и LLC малого (объем опухоли $125 \pm 15\text{ мм}^3$) и большого (объем опухоли $420 \pm 30\text{ мм}^3$) размеров.

Результаты. В результате проведенных исследований отобраны 2 субстанции: метиловый эфир О-пропилосим N-пропоксиферропорфуринимид ($\lambda_{\max} = 800\text{ нм}$) и синтетический мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорин ($\lambda_{\max} = 747\text{ нм}$), которые не агрегируют

на протяжении длительного времени, фотостабильны, проникают в клетки и концентрируются в везикулярных клеточных структурах субмикронного размера, проявляют высокую фотоиндуцированную активность в отношении опухолевых клеток различного генеза (IC₅₀ для клеток саркомы S37 составляет 100 и 32 нМ соответственно), селективно накапливаются в опухолевом очаге и быстро выводятся из организма, показывают высокую противоопухолевую эффективность при лечении мышей с опухолями малого и большого размеров (полная резорбция опухолевого очага и излеченность животных от 40 до 100 %).

Выводы. Из большого многообразия исследованных соединений отобраны 2 высокоэффективные субстанции, поглощающие в длинноволновой области спектра, позволяющие лечить опухоли большого размера и открывающие новые возможности для ФДТ.

Противоопухолевые гибридные соединения на основе стероидов

В.М. Ржезников¹, З.С. Смирнова², В.Н. Толкачев²,
Т.А. Федотчева³, Н.Л. Шимановский³

¹ФГБУ «Эндокринологический научный центр»,
Минздрава России, Москва;

²ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва;

³ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова»
Минздрава России, Москва

Гормонотерапия является одним из важнейших методов лечения рака молочной железы (РМЖ) и других гормонозависимых опухолей у женщин. В основе всех методов лежит принцип ингибирования стимулирующего действия эндогенных эстрогенов на клетки опухолей. Поэтому для лечения РМЖ применяют антиэстрогены, антагонисты ароматазы и гонадолиберин. Для усиления противоопухолевого действия антиэстрогенов исследователями из ЭНЦ и РОНЦ им. Н.Н. Блохина предложен новый тип веществ — антиэстрогеноцитостатики на основе гибридных структур, сочетающих антигормональное действие с цитотоксическим. Целевые структуры были синтезированы с использованием в качестве антигормонального фрагмента 11 α -ацилоксипроизводных эстрона, эстрадиола и 17 α -этинилэстрадиола с антиэстрогенной активностью. Их конденсацией с известным цитостатиком хлорфенацилом получен ряд принципиально новых веществ, обладающих высоким противоопухолевым действием. Путем скрининга на моделях мышинных аденокарциномы молочной железы Са 755, саркомы Са-37, меланомы В-16, карциномы легкого LLC, а также индуцированной диметилбензантраценом опухоли молочной железы крыс отобран наиболее перспективный препарат с условным названием цитэстрол ацетат (ЦА). ЦА на указанных моделях опухолей показал тор-

можение роста опухоли от 80 до 99 %, а по силе и продолжительности действия превосходил тамоксифен. Препарат обладает хемосенсибилизирующим действием, в 3 раза усиливает активность доксорубина на культуре клеток РМЖ MCF-7/R, резистентной к доксорубину. Для выяснения механизма цитотоксического действия исследовано влияние ЦА на регуляцию апоптоза путем определения экспрессии матричной РНК белков BCL-2 и Вах в клетках MCF-7. Увеличение экспрессии Вах наряду со снижением таковой для BCL-2 свидетельствует о токсическом действии ЦА, вызывающем апоптоз опухолевых клеток. Высокое сродство (87 %) к эстрогенным рецепторам в клетках РМЖ позволяет предположить о возможности стероидного фрагмента ЦА выполнять функцию вектора направленного транспорта цитостатика в опухоль.

Механизм противоопухолевого действия ормустина *in vitro* на клетки линий диссеминированной меланомы человека

Н.С. Сапрыкина¹, Д.А. Афанасьева¹, В.П. Краснов²,
М.А. Барышников¹

¹НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей
ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва;

²ФГБУН «Институт органического синтеза
им. И.Я. Постовского УрО РАН», Екатеринбург

Введение. Результаты изучения транспорта и метаболизма аминокислот и полиаминов в клетках позволили идентифицировать ряд биологических мишеней и метаболических путей, пригодных для последующего конструирования высокоселективных противоопухолевых препаратов. Ормустин — нитрозоалкилмочевинное производное аминокислоты L-орнитин — синтезирован в Институте органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН. В доклинических исследованиях *in vitro* и *in vivo* выявлена его высокая противоопухолевая активность.

Задачи исследования. Изучение механизма действия ормустина *in vitro*.

Материалы и методы. Лекарственная форма «ормустин лиофилизат для приготовления раствора для инъекций» создана в лаборатории разработки лекарственных форм РОНЦ им. Н.Н. Блохина. Исследование проводили на клеточных линиях диссеминированной меланомы человека (mel Kog, mel Ibr, mel Z, mel Mtp-X, mel Ch, mel Is), полученных в РОНЦ им. Н.Н. Блохина. Тип клеточной гибели определяли методом двойного окрашивания аннексином V-FITC и пропидием йодидом. Активность сигнальных путей апоптоза определяли по изменению уровня каспазы-3, -8, -9 в реакции иммунофлуоресценции с антителами к каспазам.

Результаты. Ормустин в IC50 через 24 ч инкубации вызывал апоптотическую гибель клеток всех исследованных линий (двойное окрашивание аннексином и пропидием йодидом), кроме mel Kog, где детектировали только окрашивание пропидием йодидом. При исследовании сигнальных путей апоптоза на линии mel Kog наблюдали активацию каспазы-8 и -9 и увеличение уровня активной каспазы-3 со временем инкубации. В клетках линий, у которых отсутствовала экспрессия рецептора внешнего пути апоптоза CD95 (mel Z, mel Mtp-X) отмечали высокий уровень активной каспазы-9 и снижение активных каспазы-8 и -3. В остальных клеточных линиях зафиксирован высокий уровень всех каспаз, что говорит о запуске как внешнего, так и митохондриального сигнальных путей апоптоза.

Выводы. Ормустин вызывает гибель клеток диссеминированной меланомы по механизму каспазозависимого апоптоза.

Работа выполнена в рамках
Государственного контракта 13411.1008799.13.163
от 12.07.2013 «Доклинические исследования
противоопухолевого лекарственного
средства класса нитрозоамочевин».

Экспрессия и очистка рекомбинантного раково-тестикулярного антигена NY-ESO-1

Ю.П. Финашутина, В.А. Мисюрин, А.В. Мисюрин

ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, Москва

Введение. Белок NY-ESO-1 относится к семейству NY-ESO-1/LAGE. Представители данного семейства — раково-тестикулярные антигены, не экспрессирующиеся в здоровых тканях, за исключением семенников. NY-ESO-1 является очень иммуногенным антигеном. Он способен индуцировать как гуморальный ответ, так и клеточный. Таким образом, белок NY-ESO-1 может быть подходящей мишенью для специфической иммунотерапии.

Задачи исследования. Получить высокоочищенный рекомбинантный раково-тестикулярный белок NY-ESO-1.

Материалы и методы. Кодировочная последовательность гена *NY-ESO-1* была искусственно синтезирована на основе 11 химически синтезированных фрагментов размером около 50 нуклеотидов (ЗАО «Евроген», Москва), методом 2-стадийной полимеразной цепной реакции. Далее кодирующая последовательность гена была клонирована в плазмиду pET-15b, и белок был экспрессирован в штамме *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS. Подлинность нуклеотидной последовательности плазмиды и гена *NY-ESO-1* подтверждена прямым секвенированием по Сэнгеру. Рекомбинантный белок

NY-ESO-1 очищен с помощью металл-аффинной хроматографии.

Результаты. Нами получена искусственно синтезированная кодирующая последовательность гена *NY-ESO-1*. Также выделена плаزمид для экспрессии гена *NY-ESO-1* в бактериальных клетках на основе вектора pET-15b. Рекомбинантный белок NY-ESO-1 был экспрессирован под контролем индуцируемого промотора в суспензионной культуре клеток *E. coli*. Подобраны условия для оптимальной экспрессии и очистки белка из бактериальных клеток. Выход целевого продукта составил 8 мг на литр бактериальной культуры. По данным электрофореза масса полученного продукта была ~18 кДа,

что соответствует массе природного белка NY-ESO-1. Чистота рекомбинантного белка оценивалась по электрофореграмме и составила 96 %.

Выводы. Получен бактериальный продуцент рекомбинантного человеческого антигена NY-ESO-1. Очищенный белок NY-ESO-1 может быть использован для широкого спектра исследований в онкологии и иммунологии, например для получения специфических антител. На основе рекомбинантного белка NY-ESO-1 можно создавать противоопухолевые вакцины с применением адъювантов. Также с помощью этого белка можно оценивать специфический гуморальный ответ в сыворотке крови онкологических больных.